负载NGF的可注射壳聚糖透明质酸水凝胶材料理化性能及生物相容性研究

段思腾[1] 李光然[1] 马义勇[1] 邱裕佳[1] 李宇[2] 王伟[1，3，4*]

（1. 锦州医科大学附属第一医院，辽宁 锦州 121000；2. 辽宁中医药大学研究生院，辽宁 沈阳 110016；3. 锦州医科大学骨外科学研究所，辽宁 锦州 121000；4. 辽宁省医学组织工程重点实验室，辽宁 锦州 121000）

（2.

摘要 目的：制备负载NGF的可注射壳聚糖透明质酸复合水凝胶，探讨其理化性能以及生物相容性。方法：首先京尼平交联制备壳聚糖透明质酸复合水凝胶材料，采用倒置法检测凝胶时间；扫描电镜观察材料形态结构；NGF释放实验、体外溶胀以及降解实验等检测凝胶材料的物理化学性能；通过MTT实验、NGF活性检测、材料与细胞共培养检测凝胶材料生物学性能。结果：在37℃条件下，可注射凝胶材料凝胶时间在37min左右，凝胶材料为多孔网络状结构，凝胶材料8周最多能够降解76%，缓释21天的NGF具有生物活性，凝胶材料能促进RSC96细胞的粘附、增殖、迁移以及细胞活性物质的释放。结论：京尼平交联的壳聚糖透明质酸水凝胶具有良好的生物相容性，能作为NGF的载体材料，具有成为神经导管内填充材料的潜能。

关键词 可注射水凝胶；壳聚糖；透明质酸；京尼平；神经生长因子

Study on physicochemical properties and biocompatibility of injectable chitosan-hyaluronic acid hydrogel loaded with NGF

DUAN Si-teng[1] LI Guang-ran[1] MA Yi-yong[1] QIU Yu-jia[1] LI Yu[2] WANG Wei[1,3,4*].

(1.The First Affiliated Hospital,Jinzhou Medical University,Jinzhou Liaoning,121000,P.R.China;2.School of Graduate,Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang,Liaoning,110016,P.R.China;3.Department of orthopedics Research Institute, Jinzhou Medical University,Jinzhou Liaoning,121000,P.R.China; 4.Key Laboratory of Medical Tissue Engineering, Liaoning Province, Jinzhou Liaoning,121000,P.R.China)

Abstract Objective: To prepare an carrier for NGF with injectable chitosan–hyaluronic acid hydrogel， and studying its physicochemical properties and biocompatibility. Methods: Preparing chitosan-hyaluronic acid hydrogel crosslinked with genipin, inverted method was used to determine the gelation time; scanning electron microscopy was used to observe the morphological structure; the physical and chemical properties were measured by NGF release, vitro swelling and degradation assay; the biological properties were measured by MTT, NGF activity assay and Co-Culture experiment. Result: Injectable hydrogel which had a structure porous network

*基金项目：辽宁省自然科学基金面上项目（201602322）、辽宁省教育厅科学技术研究地方服务项目（JYTFUDF201757）
[通讯作者]：王伟，E-mail:weiwang_ly@126.com

congealed at 37℃ in about 37 minutes, and its mostly degradation degree in 8 weeks was 76%, sustained release for 21 days with biological activity. Moreover, the chitosan–hyaluronic acid hydrogel could promote RSC96 adhesion, proliferation, migration and release of cell active substances. Conclusion:Genipin-crosslinked chitosan-hyaluronic acid hydrogel have good biocompatibility, and can be used as a carrier of NGF. It could be used as a potential filling material for nerve conduits.

Key words: injectable hydrogel；chitosan；hyaluronic acid；genipin；nerve growth factor

周围神经损伤（peripheral nerve injury，PNI）修复效果是一直困扰骨科医生的难题。端端缝合的方式可以达到治疗短距离神经缺损[1]，长段神经缺损治疗的“金标准”是自体神经移植，但是存在供体来源有限、供体区副损伤、手术区和供体神经不相匹配等缺陷，限制了其临床应用[2,3]。已有组织工程神经导管在临床上被批准使用，并且在 PNI 治疗上已取得了一定进展。但是，在长段神经缺损情况下，空载神经导管缺乏细胞外基质、神经生长因子等改善神经导管腔内微环境的填充物，治疗效果欠佳。目前已有多种生物材料、生长因子、细胞联合应用于改善 PNI 再生局部微环境。神经生长因子（nerve growth factor，NGF）治疗 PNI 有确切疗效[4-6]，但是 NGF 存在半衰期短、容易扩散、难以定位等缺点[7]，且作为一种大分子蛋白质，NGF 治疗不能通过静脉内滴注或口服给药[8]，限制了 NGF 的应用。因此，通过研制不同 NGF 载体在损伤局部释放 NGF 以提高其生物利用率成为亟需解决的问题。

水凝胶作为缓释生长因子（药物）的载体，具有良好的组织亲和性与生物降解性。由于结构类似于细胞外基质，水凝胶能填充神经导管，为新生轴突提供结构支撑，促进神经再生[9-11]。其中，可注射凝胶被广泛的运用于组织修复治疗当中。透明质酸（hyaluronic acid，HA）是细胞外基质的主要成分之一，具有良好的保水性能，既够减少受损部位瘢痕形成又能够促进轴突再生[12,13]。然而，HA 在体内降解较快，从而限制了其在 PNI 修复中的应用[14]。壳聚糖（chitosan，CS）是天然阳离子多糖，具有良好的生物相容性与生物降解性，已被广泛应用于生物医学领域，降解产物壳寡糖被证明有促进雪旺细胞（schwann cells，SCs）增殖和神经再生的作用[15,16]。但是，CS 在中性溶液中溶解度较小[17]，限制了其应用范围。

因此，通过联合制备以上水凝胶材料从而提高 NGF 生物利用率是 PNI 治疗一个绝佳的选择，国内相关研究报道较少。徐海星等[18]通过 EDC/NHS 作为交联剂，制备可注射 CS、HA 凝胶材料，缓释 NGF 取得了不错的效果，然而，交联剂的毒性可能对 PNI 修复产生不利的影响。因此，本研究采用细胞毒性小、生物相容性好、具有神经保护作用的天然交联剂京尼平[19,20]对 CS 与 HA 进行交联，制备负载 NGF 的低毒性的可注射凝胶材料。

本研究通过利用上述材料的优势互补，制备低毒性的持续释放 NGF 的可注射水凝胶材

*

料，并且对水凝胶材料的凝胶时间、孔隙率、孔径、溶胀比率、降解性、NGF 释放率以及细胞粘附增殖等方面进行评估，为 PNI 修复提供治疗新思路。

1 材料与方法：

1.1 主要材料与试剂

RSC96 细胞株（ATCC，美国）；低分化 PC12 细胞株（中科院细胞库，中国）；DMEM 培养液、RPMI/1640、青/链霉素、胰蛋白酶（HyClone，美国）；马血清（gibico，美国）；胎牛血清（SeraPro，美国）；CS（Mw=300,000，脱乙酰度≥75%）、溶菌酶、透明质酸酶、京尼平（genipin，GN）（sigma，美国）；HA（Mw 80,000-2000,000）、MTT、β-甘油磷酸（β-Glycerophosphate，β-GP）（索莱宝，中国），NGF（PeproTech，美国）等。

1.2 CS、HA 水凝胶的制备

CS、HA 水凝胶制备步骤如下：在 4℃条件下，将 0.5g CS 粉末溶解于 30ml 0.1mol/L 稀 HCL 溶液中，充分搅拌至溶解。使用β-GP（58%）溶液调节 PH 至 7.25，随后加入 GN（京尼平含量分别为 1、2、3、4mg，所得水凝胶分别为 A、B、C、D 组）与 HA 溶液，CS 与 HA 质量比为 3：1（保持 CS 质量浓度 1%），均匀混合。在 37℃条件下，缓慢注射到 48 孔板中，得到 CS、HA 水凝胶，记复合水凝胶为 CS-HA。

1.3 凝胶时间测定

将液态 CS-HA 注射到西林瓶中开始计时，每隔 1min 颠倒一次西林瓶，观察凝胶状态，直至瓶内没有液体流动并保持 1min，说明该溶液已形成凝胶，所需时间记为凝胶时间。

1.4 红外光谱仪检测

分别将 CS、HA、CS-HA 磨碎后通过与溴化钾混合压片，在 4000cm^{-1}-500cm^{-1} 区间测定其红外光谱。

1.5 扫描电子显微镜观察凝胶的结构

真空干燥后 CS-HA 样品固定于观察架上，对凝胶材料表面喷金处理后，于扫描电子显微镜（scanning electron microscope，SEM）（JSM-6360LV，日本）下观察、拍照。

1.6 孔隙率检测

真空冷冻干燥后，将具有规则形状（V0）的 CS-HA 浸入装有乙醇的密封容器中，并静置至无气泡产生。初始状态（W0）和平衡态（Wt）之间的重量差是水凝胶孔中的乙醇重量。孔隙体积（Vp）使用下式计算：Vp=（Wt-W0）/ρ 其中，ρ 是乙醇的密度。孔隙率（%）用下式计算：孔隙率（%）= Vp/V0×100%。

1.7 体外溶胀和降解实验

*

将冷冻干燥后的CS-HA称重，记为W0。37℃条件下，于PBS（PH=7.4）溶液中浸泡。一定时间后，取出溶胀的水凝胶，立即用滤纸擦去表面多余的水分，直到水凝胶的重量不再改变则达到溶胀平衡。溶胀比率（SR）计算如下：SR（%）=（Wt-W0）/W0×100%。其中Wt和W0是溶胀状态和冻干状态下CS-HA的重量。

在37℃条件下，将初始重量为W0，形态规则的冻干水凝胶材料浸入PBS（pH=7.4）溶液内8周，其中溶菌酶的浓度为5000U/mL、透明质酸酶浓度为100U/mL，每天更换新鲜PBS溶液以及相关的酶类。分别在1、3、5、7、10、13、17、 21、28、35、42、49和56天，从降解溶液中收集水凝胶，干燥后称重，记为Wt。水凝胶材料降解速率计算公式如下：降解速率（%）=（Wt-W0）/W0×100%其中，W0是水凝胶的初始重量。

1.8 NGF释放实验

如前所述制备出CS-HA，溶液状态下加入200ng/ml NGF，均匀搅拌，在37℃缓慢注入24孔板，形成CS-HA-NGF复合凝胶。37℃条件下，在PBS（PH=7.4）溶液中检测NGF释放量，分别在1、3、5、7、10、13、17、21、28、35、42、49和56天收集PBS溶液，并向每孔中加入新配置的PBS（PH=7.4），使用酶联免疫吸附测定（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）检测NGF释放量。

1.9 NGF生物活性测定

将PC12于1640培养基培养作为阴性对照组，不同时间点（1、3、5、7、10、13、17、21）CS-HA材料释放的NGF与PC12共培养作为实验组，培养三天后，测定具有阳性细胞（细胞神经突长度≥细胞胞体长度）的百分比。

1.10 MTT检测

RSC96细胞系是源自大鼠SCs长期培养的SCs细胞系，被广泛用于周围神经的相关研究[21,22]。在37℃条件下，将形态规则的水凝胶材料完全浸入1640培养基（CS-HA与1640培养基按按0.1g/mL浸提24h），置于4℃冰箱备用。取生长状态良好的RSC96，使用胰蛋白酶消化，计数RSC96，制备浓度为1×10^4个/mL的细胞悬液，均匀接种在96孔板上（100μL/孔），培养1、3、5天后按照MTT试剂盒方法操作，在490nm波长下，测其光密度（optical density，OD）值。

1.11 细胞粘附性能实验

使用75%乙醇将冷冻干燥的CS-HA材料消毒3次，每次15min，然后，使用无菌PBS（pH=7.4）洗涤3次，每次10min，随后，在接种RSC96前使用含10%胎牛血清和1%青/链霉素的1640培养基将材料预处理2小时。RSC96细胞悬液（5×10^5个/ml）与CS-HA材

*

料在 24 孔板中共同培养，48h 正常换液一次，72h 后，吸出培养基，在 4℃下加入 2.5％戊二醛固定水凝胶材料 10 小时。固定后在梯度叔丁醇溶液中脱水，进行 SEM 检测。

1.12　统计学方法

实验数据采用 SPSS19.0 统计学软件进行统计分析，计量资料采用均数±标准差（ $\bar{x}$±s）表示，多组间比较采用单因素方差分析进行比较，两组比较采用 t 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1　凝胶时间、孔径大小及孔隙率

表 1　不同组别水凝胶的凝胶时间、孔径、孔隙率

Table 1　Gelation time, average pore size and porosity of hydrogels with different mass ratios GN

组别	GN 含量（mg）	凝胶时间（min）	孔径（μm）	孔隙率（%）
A	1	38.25±3.10	42.90±9.51	70.35±2.28
B	2	38.25±1.26	40.68±11.87	66.97±3.23
C	3	36.00±2.83	36.33±16.65	62.13±3.43
D	4	37.00±1.83	34.27±15.31	57.37±3.61

37℃，PH 7.4 条件下，四组材料凝胶时间分别为 38.25±3.10min、38.25±1.26min、36.00±2.83min 和 37.00±1.83min，凝胶时间均在 37min 左右，GN 含量改变对凝胶时间没有显著影响。A-D 组的孔径大小分别为 42.90±9.51μm、40.68±11.87μm、36.33±16.65μm 和 34.27±15.31 μm, 孔隙率大小分别为 70.35±2.28％、66.97±3.23％、62.13±3.43％和 57.37±3.61％。随着 GN 含量的增加，CS-HA 孔径逐渐减小，孔隙率也逐渐减小。说明改变 GN 含量，能够调控 CS-HA 的孔径以及孔隙率。

2.2　红外光谱检测

*

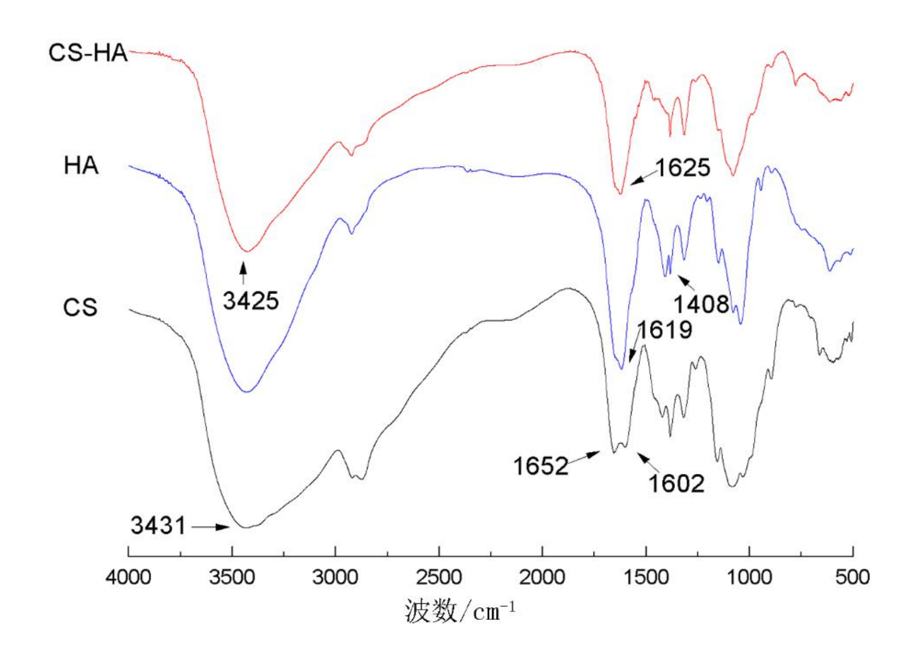


图 2　不同凝胶材料的红外光谱图分析

Figure 2　FTIR spectra of different gel materials

图 2 为 CS-HA 红外光谱图，由 CS 的曲线可得，3431cm^{-1} 处为-NH2 伸缩振动吸收峰与-OH 伸缩振动吸收峰叠加形成的，1652cm^{-1} 与 1602cm^{-1} 分别为酰胺吸收峰以及氨基特征吸收峰。由 HA 的曲线可得，1619cm^{-1} 与 1408cm^{-1} 为 HA 羧基对称伸缩与羧基不对称伸缩的特征性吸收峰。对比曲线 CS 与 CS-HA 可见，3431cm^{-1} 处在 CS-HA 中向低频方向移动为 3425cm^{-1}，说明在 CS 与β-GP 之间有配位键形成，主要是由于 N-H 键能量减弱导致的，而在 1602cm^{-1} 处吸收峰消失说明有氢键配合物形成。由 CS-HA 曲线 1625cm^{-1} 吸收峰增强，说明 CS 与 GN 发生交联反应，形成了大量酰胺基团，这表明 CS 的氨基参与了交联反应，红外结果分析表明，四种物质成功交联形成 CS-HA 水凝胶。

2.3　扫描电镜观察

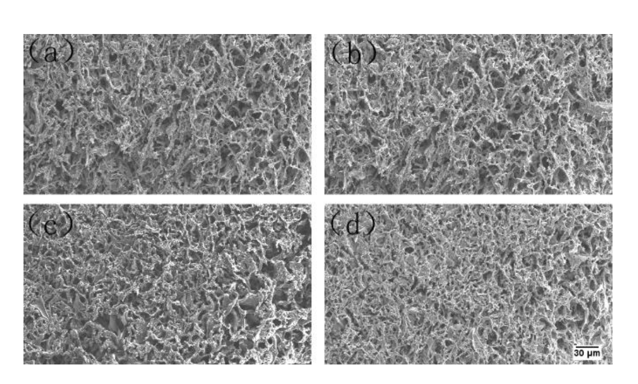


图 3 冻干 CS-HA 凝胶扫描电镜观察

Figure 3　The SEM images of CS-HA hydrogels

(a) group A, (b) group B, (c) group C, (d) group D　(1000 ×) scale bar: 30 μm

*

图 3 为使用不同组别的 CS-HA 电镜观察结果，由图可见冷冻干燥较好地保留了 CS-HA 材料的多孔网络状结构，有利于物质交换及细胞迁移，随着 GN 含量的增加，凝胶网络状结构更致密，孔径逐渐减小，网孔数量减少，内部结构更加均一、稳定。

2.4 体外溶胀以及降解性

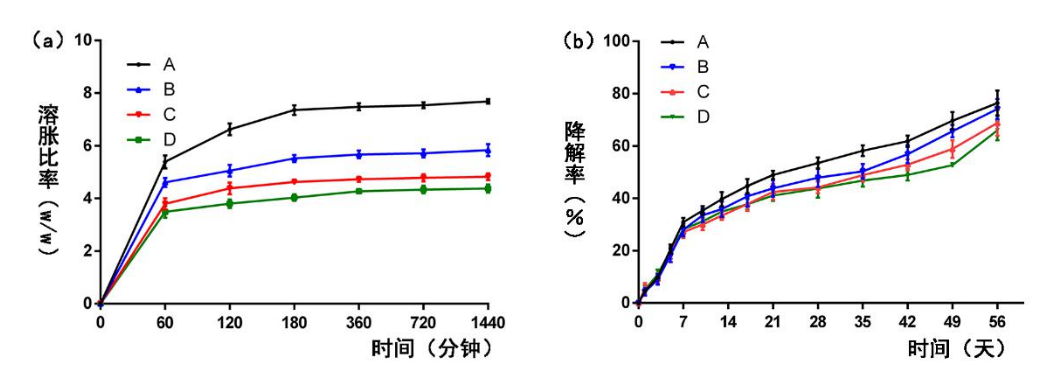


图 4 CS-HA 溶胀比率与降解率时间动态图

Figure 4 The swelling and degradation of CS-HA hydrogels time dynamic graph

（a）the swelling ratio of CS-HA hydrogels;（b）the weight loss of CS-HA hydrogels

图 4（a）为不同水凝胶在 PBS（PH=7.4）中溶胀性能情况。在 0-180min，凝胶材料溶胀比率迅速增加，180min 后略微增加并逐渐趋于溶胀平衡。A-D 组 GN 浓度增加，凝胶孔隙结构更为致密，内部结构更稳定，材料溶胀比率逐渐减小，对药物的释放以及细胞的迁移作用减弱。

水凝胶降解曲线如图 4（b）所示，A-D 组在第 7d 的降解率分别为 30.91±1.58％、27.98±2.44％、27.13±2.26％与 28.20±1.98％，CS-HA 未交联部位在生物酶的作用下快速降解，降解速率明显加快，在 7d 以后，CS-HA 的降解需要克服化学键抵抗，降解速率减慢，随着 GN 含量的增加，凝胶结构致密，抗酶解作用增强，A-D 组的降解速率逐渐降低。A-D 组降解速率组间比较（$p<0.005$；有统计学意义），表明改变 GN 含量，在一定范围内 CS-HA 凝胶材料的降解率可以调控。

2.5 NGF 释放试验

凝胶材料 NGF 累计释放量见图 5 所示，NGF 释放主要存在两个阶段，第一阶段：0-1 天， NGF 释放速率是整个阶最大释放率，A-D 组分别为 33.72±2.16％、31.32±4.22％、28.95±3.96％、29.05±1.48％。第二阶段：1-21 天，随着 CS-HA 材料的持续降解，NGF 释放速率保持在一个稳定的高水平，其中 A 组释放总量最多，达到 79.21±2.51％，而 D 组总量释放最少，为 71.26±2.89％。在 21 天以后，NGF 释放量基本达到稳定状态，仅有微量增长，CS-HA 对 NGF 的有效缓释能达 21 天，说明 CS-HA 是 NGF 良好的载体材料。A-D 组 NGF

*

释放率组间比较（$p<0.005$；有统计学意义），表明改变凝胶材料 GN 浓度，能够改变 NGF

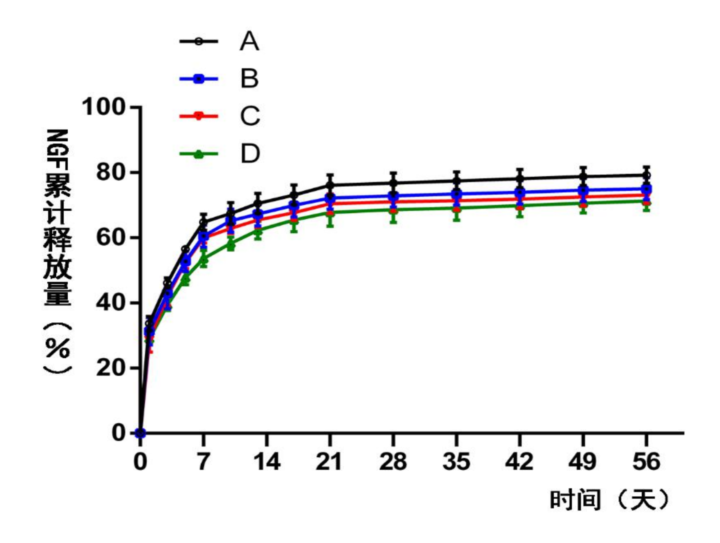


图 5　NGF 累计释放曲线

Figure 5　Cumulative NGF release

释放速率。

2.6　NGF 生物活性测定

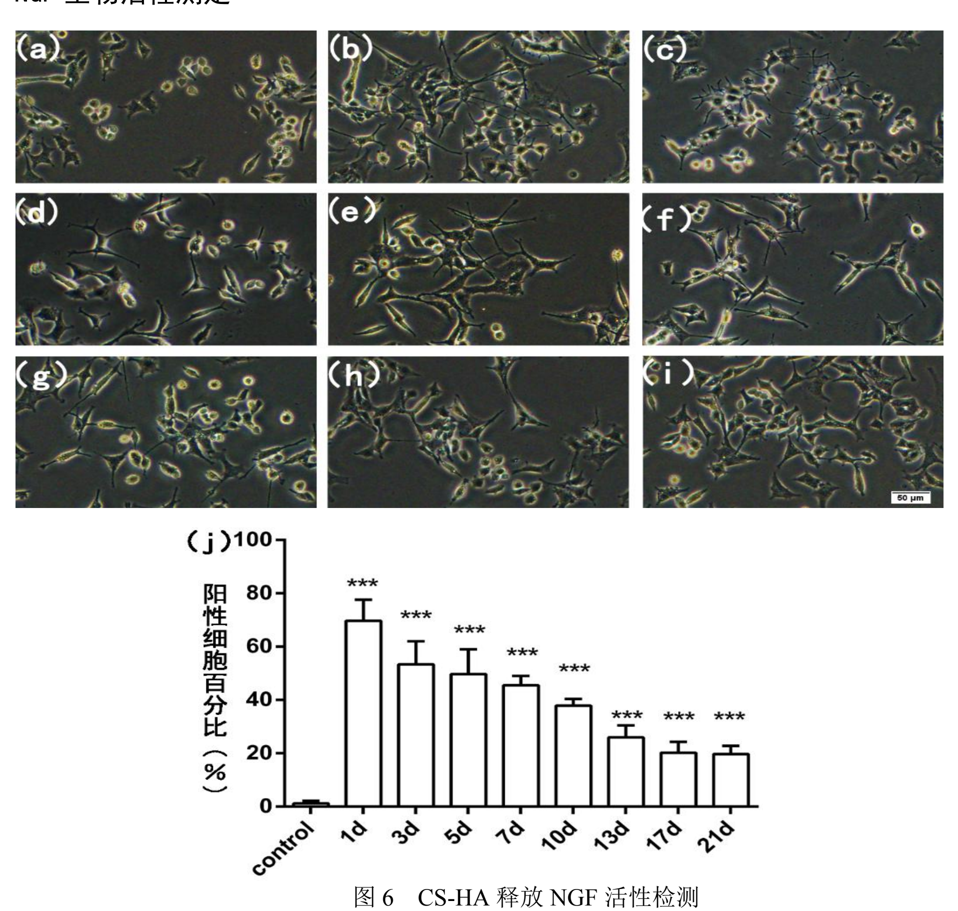


图 6　CS-HA 释放 NGF 活性检测

Figure 6　Bioactivity assay of released NGF from CS-HA hydrogels

the morphology of PC12 cells (a) in culture medium (negative control group);(b–i) in the release medium collected from CS-HA/NGF hydrogels at the 1st, 3rd, 5th, 7th, 10th,13th,17 th and 21st day, (100 ×)scale bar: 50 μm; (j) the percentage of PC12 cells with neurites.***$p<0.005$

*

由图可见，（a）组正常 PC12，为不规则半贴壁细胞。（b-i）组不同时间点释放的 NGF 均能够诱导 PC12 细胞呈现神经细胞表型，计数阳性细胞比例，分别与 a 组（阴性对照）相比（P<0.005；有统计学意义），说明 CS-HA 缓释 1-21 天的 NGF 均具有生物活性。由此得出 CS-HA 能够持续有效缓释 NGF。

2.7 MTT 实验

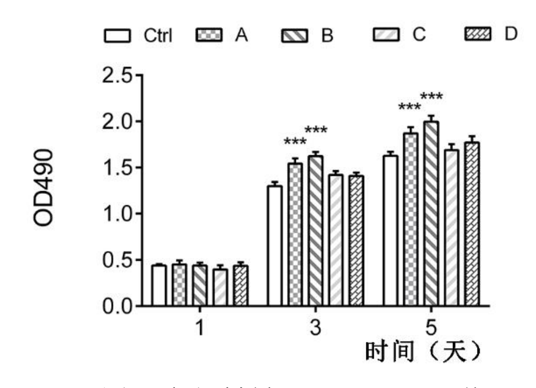
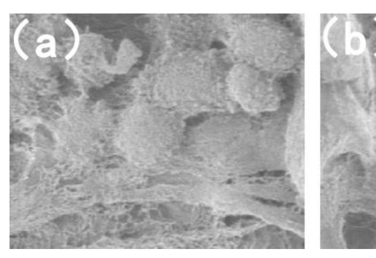


图 7 各组材料 1、3、5 天 OD 值

Figure 7 Each group of materials 1、3、 5 days OD value ***p＜0.005

各组材料在培养 1、3、5 天的 OD 值结果如上图， 培养 1 天后，5 组样本的 OD 值无明显差异；与对照组相比，A 组在第 3、5 天 OD 值明显升高（P_3＜0.005，P_5＜0.005），B 组在培养第 3、5 天 OD 值与对照组相比也具有统计学差异（P_3＜0.005，P_5＜0.005），而 CD 两组 OD 值与对照组相比没有明显差异。结果表明，A、B 两组 CS-HA 对 RSC96 细胞增殖有促进作用。

2.8 凝胶材料 SEM 观察



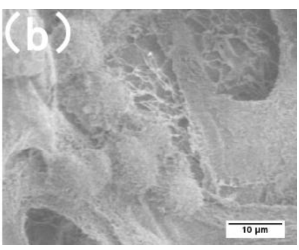


图 8 RSC96 与 CS-HA 材料共培养电镜照片

Figure 8 The SEM images of RSC96 cells seeded on CS-HA hydrogels

(a) group A and (b) group B; after culture for 3 days at (a, b) 1000×, scale bar: 10 μm

SEM 结果显示 RSC96 在 CS-HA 材料上生长，经固定脱水后，RSC96 细胞有轻微皱缩，表面形态良好，聚集成团与材料粘附紧密，在材料表面可见 RSC96 分泌的细胞活性物质，

*

表明 CS-HA 具有良好的生物相容性，能够支持 RSC96 的粘附。（见图 8）

讨论

神经损伤修复治疗已有了 100 多年的历史，仅有 50％的患者能够通过治疗恢复功能[23]。然而，目前主要的治疗方式方法都有其自身的局限性，因此，探究 PNI 治疗的新方法一直是研究热点。理想的水凝胶材料应当具备以下特点：易于获取；具有良好的生物活性与稳定性；具备适宜降解性；能负载生长因子（药物）。本研究以 GN 作为交联剂，CS 与 HA 为原料制备负载 NGF 的可注射水凝胶材料，为 PNI 治疗提供新的思路。

β-GP、CS 水凝胶材料最早由 Chenite 等[24]合成，β-GP 作为交联剂，使 CS 水凝胶材料具有温敏性，这种水凝胶材料在室温或者低于室温能够长期保持液体状态，而当温度升高到体温（37℃）则能够迅速形成凝胶，是应用和研究较为广泛的一类水凝胶材料[25-27]。由于其具独特的温敏性特点，在组织工程研究有良好的应用前景，晁秀华等[28]利用β-GP 交联 CS 水凝胶材料负载 NGF 修复大鼠面神经缺损，NGF 释放试验显示第 1d 释放率达 60％，存在明显突释现象。本研究在上述温敏凝胶体系中引入天然交联剂 GN，NGF 第 1d 释放量在 30％左右，稳定缓释达 21 天。加入 GN 的 CS-HA 水凝胶材料，与β-GP、CS 温敏水凝胶材料相比，在缓释 NGF 性能上有一定的增强。

传统神经导管内支架材料在临床运用中，需要面临以下问题：支架植入方式的选择、增加感染风险以及支架与损伤局部不匹配等[29]。与其相比，可注射水凝胶材料操作简便快捷，能够很好的充填神经导管，避免了以上问题。本研究制备的 CS-HA 复合凝胶材料，在 37℃条件下，37min 左右能够形成凝胶，可以通过简单的注射或者压入到达损伤部位，给手术操作留下了充足时间。

既往研究表明，PNI 后具有再生能力，是因为 SCs 具备一定的再生能力[30]，所以治疗 PNI 的材料必须与 SCs 具有良好的相容性，以促进 SCs 的粘附与增殖。本实验细胞共培养电镜结果显示，CS-HA 能促进 RSC96 粘附。MTT 结果表明，CS-HA 对 RSC96 无细胞毒性，且促进其增殖。

其次，具有合适孔隙率以及孔径的材料能够有利于细胞的迁移以及营养物质的交换。Valeria 等[31]提出神经导管内填充材料的适宜的孔隙率为 60-80％，孔径为 30μm-50μm，有利于 SCs 迁移至 PNI 远端。通过电镜图片的结果分析，CS-HA 孔径在 42μm-34μm，孔隙率在 57％-70％，适合 SCs 的迁移。细胞与材料共培养可以得出，CS-HA 材料与 SCs 有良好的相容性，有利于 SCs 粘附。

此外，PNI 损伤后自身再生能力有限，因此水凝胶材料应具备负载药物的功能。选择

*

负载 NGF 进行载药性能检测主要是以下两方面因素：通过 ELISA 能定量检测 NGF 释放量；NGF 对 PC12 具有可逆的神经元显形反应，从 PC12 形态学改变上定性检测 NGF 是否具有生物活性。目前临床上使用的 NGF 治疗 PNI 均是通过肌肉注射的方式，一天一次，三到六周一疗程，大部分患者注射后局部出现疼痛，依从性不佳。本实验制备的 CS-HA 凝胶材料，能在损伤局部持续稳定释放 NGF，在治疗最佳时间窗（三周内）[32]能保持较高浓度，避免了局部反复注射，是理想的 NGF 载体材料。

目前公认的神经再生轴突生长速率为 1-3mm/d[31]，然而不同损伤部位神经的直径以及长度不同，不同患者的再生速率也不一致，对于凝胶材料运用于临床治疗 PNI 是一个很大的挑战。如何制备降解速率与新生轴突生长速率一致的材料，即材料具有可控降解性，在神经再生时提供营养物质及结构支持，及时降解，降解速率与轴突生长速率相匹配，不阻碍新生轴突的生长。本实验通过改变 GN 的含量，在一定程度上能够调控凝胶材料降解率，尽管 CS-HA 凝胶材料降解率未能达到与轴突生长相匹配，但其具备一定程度的可控降解性满足神经导管填充材料的基本原则。

综上，本研究制备的 CS-HA 水凝胶材料能够满足治疗 PNI 神经导管内填充材料的基本要求，能为 PNI 后 SCs 修复再生提供更有利的微环境。下一步本实验将进行体内降解性能以及生物相容性等相关研究，进一步探讨其作为神经导管填充材料的可行性。

参考文献：

1. Zhu S, Ge J, Wang Y, et al. A synthetic oxygen carrier-olfactory ensheathing cell composition system for the promotion of sciatic nerve regeneration.[J]. Biomaterials, 2014, 35(5):1450-61.
2. Jiang X, Lim S H, Mao H Q, et al. Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits[J]. Experimental Neurology, 2010, 223(1):86-101.
3. Ijkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, et al. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation[J]. Biomaterials, 2004, 25(9):1583-92.
4. Davies S W, Beardsall K. Nerve growth factor selectively prevents excitotoxin induced degeneration of striatal cholinergic neurones.[J]. Neuroscience Letters, 1992, 140(2):161-4.
5. Martínez-Serrano A, Björklund A. Protection of the neostriatum against excitotoxic damage by neurotrophin-producing, genetically modified neural stem cells[J]. Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience, 1996, 16(15):4604-16.
6. Madduri S, Papaloïzos M, Gander B. Synergistic effect of GDNF and NGF on axonal branching and elongation in vitro[J]. Neuroscience Research, 2009, 65(1):88-97.
7. Navarro X, Krueger T B, Lago N, et al. A critical review of interfaces with the peripheral nervous system for the control of neuroprostheses and hybrid bionic systems.[J]. Journal of the Peripheral Nervous System, 2005, 10(3):229-58.
8. Zhao Y Z, Jiang X, Xiao J, et al. Using NGF heparin-poloxamer thermosensitive hydrogels to enhance the nerve regeneration for spinal cord injury[J]. Acta Biomaterialia, 2016,

*

29:71-80.
9. Li C, Liu K K, Tsao C Y, et al. Neuronal differentiation of human placenta-derived multi-potent stem cells enhanced by cell body oscillation on gelatin hydrogel[J]. Journal of Bioactive & Compatible Polymers, 2014, 29(6):529-544.
10. Carballomolina O A, Velasco I. Hydrogels as scaffolds and delivery systems to enhance axonal regeneration after injuries[J]. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2015, 9: 1-12.
11. Bellamkonda R V. Peripheral nerve regeneration: an opinion on channels, scaffolds and anisotropy.[J]. Biomaterials, 2006, 27(19):3515-3518.
12. Özgenel GY. Effects of hyaluronic acid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats[J]. Microsurgery, 2003, 23(6):575-581.
13. Lei Y, Gojgini S, Lam J, et al. The spreading, migration and proliferation of mouse mesenchymal stem cells cultured inside hyaluronic acid hydrogels[J]. Biomaterials, 2011, 32(1):39-47.
14. Xiao Z S, Liu Y, Palumbo F S, et al. In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering[J]. Biomaterials, 2004, 25(7-8):1339-48.
15. Zhao Y, Wang Y, Gong J, et al. Chitosan degradation products facilitate peripheral nerve regeneration by improving macrophage-constructed microenvironments.[J]. Biomaterials, 2017, 134:64-77.
16. Wang Y, Zhao Y, Sun C, et al. Chitosan Degradation Products Promote Nerve Regeneration by Stimulating Schwann Cell Proliferation via miR-27a/FOXO1 Axis.[J]. Molecular Neurobiology, 2016, 53(1):28-39.
17. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery.[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010, 62(1):83-99.
18. Xu H, Zhang L, Bao Y, et al. Preparation and characterization of injectable chitosan-hyaluronic acid hydrogels for nerve growth factor sustained release[J]. Journal of Bioactive & Compatible Polymers Biomedical Applications, 2016, 32(2):1-17.
19. Mi F L, Tan Y C, Liang H F, et al. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant.[J]. Biomaterials, 2002, 23(1):181-191.
20. Akao T, Kobashi K, Aburada M. Enzymic studies on the animal and intestinal bacterial metabolism of geniposide[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1994, 17(12):1573-6.
21. Geuna S, Raimondo S, Fregnan F, et al. In vitro models for peripheral nerve regeneration.[J]. European Journal of Neuroscience, 2016, 43(3):287-296.
22. Mokarram N, Merchant A, Mukhatyar V, et al. Effect of modulating macrophage phenotype on peripheral nerve repair[J]. Biomaterials, 2012, 33(34):8793-801.
23. Lee S K, Wolfe S W. Peripheral nerve injury and repair.[J]. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2000, 8(4):243-252.
24. Chenite A, Chaput C, Wang D, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ[J]. Biomaterials, 2000, 21(21):2155-2161.
25. Cho J, Heuzey M C, Begin A, et al. Physical Gelation of Chitosan in the Presence of beta-Glycerophosphate:The Effect of Temperature[J]. Biomacromolecules, 2005, 6(6):3267-75.
26. Kim S, Nishimoto SKBumgardner J D, Haggard W O, et al. A chitosan/beta-glycerophosphate thermo-sensitive gel for the delivery of ellagic acid for the treatment of brain cancer.[J]. Biomaterials, 2010, 31(14):4157-4166.

*

27. Wang W, Zhang P, Shan W, et al. A novel chitosan-based thermosensitive hydrogel containing doxorubicin liposomes for topical cancer therapy.[J]. Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, 2013, 24(14):1649-59.
28. Chao X, Xu L, Li J, et al. Facilitation of facial nerve regeneration using chitosan-β-glycerophosphate-nerve growth factor hydrogel[J]. Acta oto-laryngologica, 2016, 136(6):1-7.
29. Sivashanmugam A, Kumar R A, Priya M V, et al. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering[J]. European Polymer Journal, 2015, 72:543-565.
30. Bunge R P. The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration[J]. Journal of Neurology, 1994, 242(1):S19-S21.
31. Chiono V, Tonda-Turo C. Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering[J]. Progress in Neurobiology, 2015, 131:87-104.
32. Morandi S, Brasca M. Early regenerative effects of NGF-transduced Schwann cells in peripheral nerve repair[J]. Molecular & Cellular Neurosciences, 2012, 50(1):103-112.

*